Bioszkła żelowe z dodatkiem srebra i ceru

KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA

Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Technologii Szkła i Powłok Amorficznych, e-mail: cholewa@agh.edu.pl

Wprowadzenie

Obecnie główną bronią w walce z infekcją podczas implantacji biomateriałów jest profilaktyka w postaci podawania antybiotyków. Jednakże długotrwałe stosowanie antybiotyku powoduje nieodwracalne wyniszczenie flory bakteryjnej w ciele ludzkim. Drogą do rozwiązania tego problemu może być zastosowanie materiału bioaktywnego wykazującego jednocześnie właściwości antybakteryjne. Materiałami o takich właściwości są bioszkła i biomateriały szklanokrystaliczne zawierające w swoim składzie jony Ag lub Ce. Od dawna znane są lecznicze właściwości srebra, które posiada działanie bakterio- i grzybobójcze [1,2]. Srebro wykorzystywane jest w formie zawiesiny koloidalnej, srebra metalicznego lub też w postaci jonów Ag^+. Podobne właściwości antybakteryjne wykazuje również cer [3]. Materiały bioaktywne zawierające w swym składzie srebro lub cer można otrzymywać różnymi sposobami: poprzez topienie szkieł, wymianę jonową oraz metodą zol-żel [4-6]. Niniejsza praca dotyczy syntezy bioszkieł z dodatkiem srebra lub ceru przy zastosowaniu metody zol-żel, ich charakterystyki strukturalnej oraz wstępnej oceny ich zachowania się w środowisku symulowanego płynu fizjologicznego.

Materiały i metodyka badań

Metodą zol-żel otrzymano szkła z układu Cao-P_2O_5-SiO_2 z dodatkiem Ag_2O (0,5-3%mol.) oraz CeO_2 (0,5-2%mol.). Ze względu na zawartość głównych składników materiały podzielono na serie: SAg, SCe - materiały wysokokrzemianowe (koncentracja SiO_2 77-80% mol., CaO 16 %mol., P_2O_5 4%mol) z dodatkiem odpowiednio Ag_2O lub CeO_2 , AAg, ACe - materiały wysokowapniowe (koncentracja CaO 51-54 %mol., SiO_2 40%mol., P_2O_5 6%mol.). Materiał kontrolny stanowiły szkła bez dodatku Ag/Ce. Jako materiały wyjściowe wprowadzające poszczególne tlenki zastosowano tetraetyloortokrzemian (TEOS – $Si(OC_2H_5)_4$), fosforan (V) trietylu $OP(OC_2H_5)_3$, oraz azotany: wapnia $Ca(NO_3)_2 6H_2O$, srebra $AgNO_3$, ceru $Ce(NO_3)_3 6H_2O$. Syntezy prowadzono w środowisku alkoholu etylowego, jako katalizatora reakcji hydrolizy i polikondensacji użyto kwasu HNO_3. Przygotowane roztwory pozostawiono w warunkach otoczenia aż do zżelowania. Uzyskane żele suszono w temperaturach 40-130°C przez 5 dni, a następnie wygrzewano w temperaturze 700°C przez 10 godzin.

Dla żeli po obróbce termicznej w temperaturze 700°C przeprowadzono badania spektroskopowe FTIR (Bio-Rad FTS 60V) (rys. 1-4) i dyfrakcyjne XRD (X Pert Philips) (rys. 5).

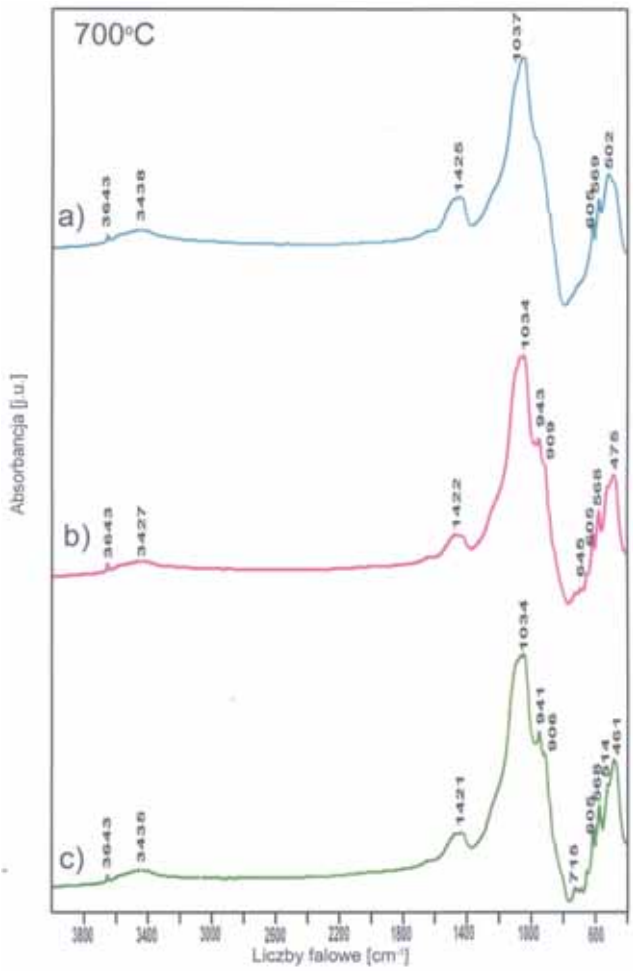
Oceniono również wpływ dodatku srebra i ceru na właściwości bioaktywne uzyskanych materiałów. W tym celu przeprowadzono test w symulowanym osoczu (SBF), przetrzymując w nim granulki bioszkieł o frakcji ziarnowej 0,5-0,8 mm przez 3, 7, 10 dni. Ocenie poddano zmiany powierzchni granul po kontakcie z SBF w różnych okresach czasu. Obserwacje i analizę składu powierzchni przeprowadzono na mikroskopie skaningowym JEOL 5700 współpracującym z mikrosondą rentgenowską (rys.6-7).

Wyniki badań i dyskusja

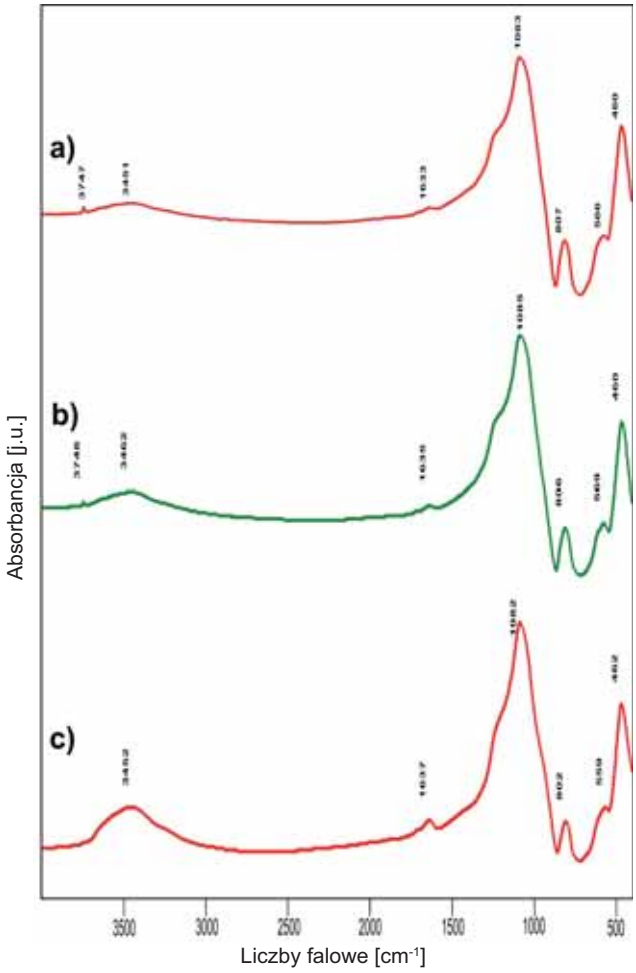
Celem oceny struktury i składu fazowego uzyskanych materiałów przeprowadzono badania spektroskopowe FTIR oraz dyfrakcyjne XRD.

W widmach FTIR materiałów serii S (wysokokrzemianowe) otrzymanych po obróbce termicznej w temperaturze-700°C obecne są trzy główne pasma charakterystyczne dla drgań struktur krzemianowych Si-O-Si w zakresach: 460-463 cm^{-1} – drgania zginające O-Si-O, ok. 800cm^{-1} – drgania rozciągające Si-O-Si, ok. 1080 cm^{-1} – drgania rozciągające. Widoczne są również pasma pochodzące od wody i związanych w strukturze grup OH. Pasmo położone w zakresie 3400-3500 cm^{-1} jest wspólnym efektem asymetrycznych drgań rozciągających grup OH związanych w strukturze oraz drgań rozciągających O-H pochodzących z cząsteczek wody zawartych w porach materiału. Obecności cząsteczek wody dowodzi również pasmo przy ok. 1630 cm^{-1} przypisane drganiom zginającym wiązania O-H.

Dla materiałów serii A (wysokowapniowe) widoczne są tylko dwa charakterystyczne dla struktur krzemianowych pasma ok. 1050cm^{-1} i 480cm^{-1}. Obecność wody i grup OH potwierdzają pasma 3400-3500 cm^{-1} i ok. 1630 cm^{-1} przypisane analogicznie jak dla żeli serii S, drganiom zginającym grup OH w cząsteczkach wody i drganiom rozciągającym wiązań Si-OH i P-OH. Dodatkowo występuje tu również mało intensywne pasmo przy ok. 960cm^{-1} (asymetria pasma



Rys. 2. Widma FTIR żeli serii AAg po wygrzewaniu w temperaturze 700°C: a) 1%Ag_2O, b) 2%Ag_2O, c) 3%Ag_2O



Rys. 3. Widma FTIR żeli serii SCe po wygrzewaniu w temperaturze 700°C: a) 0,5%CeO_2, b) 1%CeO_2, c) 2%CeO_2

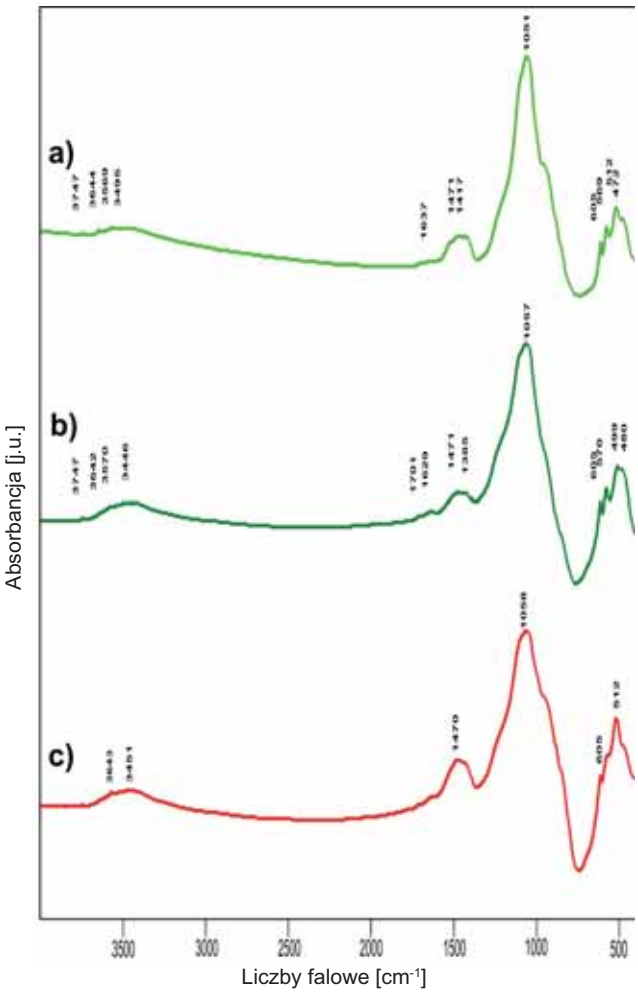
z max. przy ok. 1050 cm^{-1}) pochodzące od deformacyjnych drgań grup OH związanych z Si i P.

Dla wszystkich materiałów serii A i dla materiałów serii S o 2-3% zawartości Ag_2O widoczne są pasma charakterystyczne dla drgań wiązań w grupach fosforanowych apatytu przy ok. 570 i 605 cm^{-1} (drgania zginające O-P-O). W zakresach liczb falowych odpowiadających drganiom wiązań Si-O-Si znajdują się również drgania wiązań P-O-P w ugrupowaniach fosforanowych co powoduje koincydencję drgań i utrudnia interpretację widm. Niemniej jednak, ze względu na występowanie pasm 570 i 605 cm^{-1} , w pasmach przy ok. 1050-1080cm^{-1} oraz 460-480 cm^{-1} obecne są drgania związane z grupami $[PO_4]$ w strukturze materiału. Pasma te można przypisać odpowiednio drganiom rozciągającym P-O-P oraz drganiom zginającym O-P-O. Kombinacja drgań P-O-P i Si-O-Si w przypadku materiałów serii S powoduje asymetrię pasma z maksimum przy 1080 cm^{-1}. Poszerzenie tego pasma aż do ok. 1220cm^{-1} może świadczyć o występowaniu w strukturze materiałów wiązań P=O. Dodatkowo dla materiałów serii A z 2 i 3 % mol. udziałem tlenku srebra widoczne są ostre lecz mało intensywne pasma w zakresach 511 - 517 cm^{-1}, 712-880 cm^{-1} 905-1000 cm^{-1}. Obecność tych pasm jest wynikiem częściowej krystalizacji materiałów; krystalizacja HAp powoduje pojawienie się pasm w zakresie 920-1000 cm^{-1} , natomiast pasma w zakresie niższych liczb falowych związane są najprawdopodobniej z tworzeniem się krzemianów wapnia.

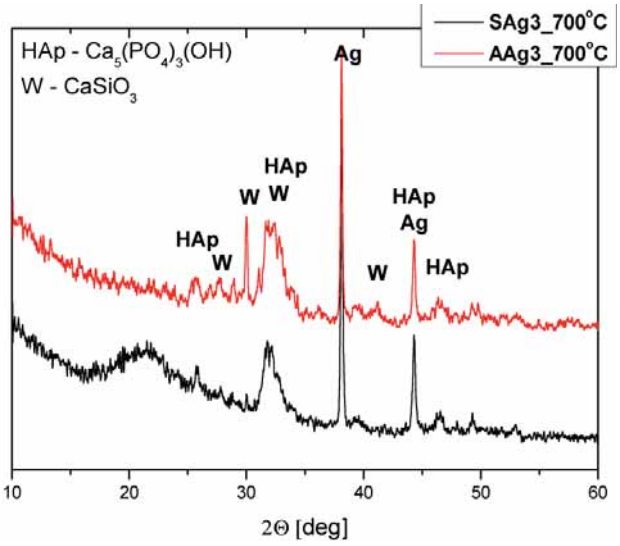
Charakter widm FTIR żeli z dodatkiem Ag_2O sugeruje możliwość początku krystalizacji fosforanu oraz krzemianu wapnia, przy czym zdecydowanie wyraźniejszy początek krystalizacji wykazują materiały serii AAg. Efekt ten najprawdopodobniej związany jest obecnością srebra w składzie materiału i działaniem tego pierwiastka jako katalizatora krystalizacji [7,8].

Widma FTIR żeli zawierających CeO_2 nie wykazują istotnych różnic w zależności od koncentracji tlenku ceru. Jedynie dla materiału ACe2 następuje zmniejszenie się intensywności pasm przy ok. 570 i 605 cm^{-1}.

Analiza składu fazowego granul serii A, przeprowadzona metodą dyfrakcji rentgenowskiej, wskazuje na krystalizację HAp i wollastonitu w materiałach z 2-3% dodatkiem Ag_2O. W przypadku serii S 3% zawartość Ag_2O powoduje krystalizację apatytu. Dodatkowo przy koncentracji tlenku srebra w ilości 3%mol. Zarówno dla materiałów typu A jak i S pojawia się metaliczne srebro. Materiały podstawowe, bez dodatku Ag_2O są albo amorficzne (S) albo też przeważa w nich faza amorficzna, obok której pojawia się niewielka ilość fazy krystalicznej (najprawdopodobniej HAp) – A [9,10]. Podobnie jak materiały podstawowe zachowują się bioszkła serii ACe i SCe. Wyniki badań dyfrakcyjnych potwierdzają również przyspieszające krystalizację działanie srebra. Pojawienie się metalicznego srebra dla żeli o koncentracji Ag_2O 3%mol wskazuje na redukcję jonów srebra i jego odmieszanie ze struktury żeli.

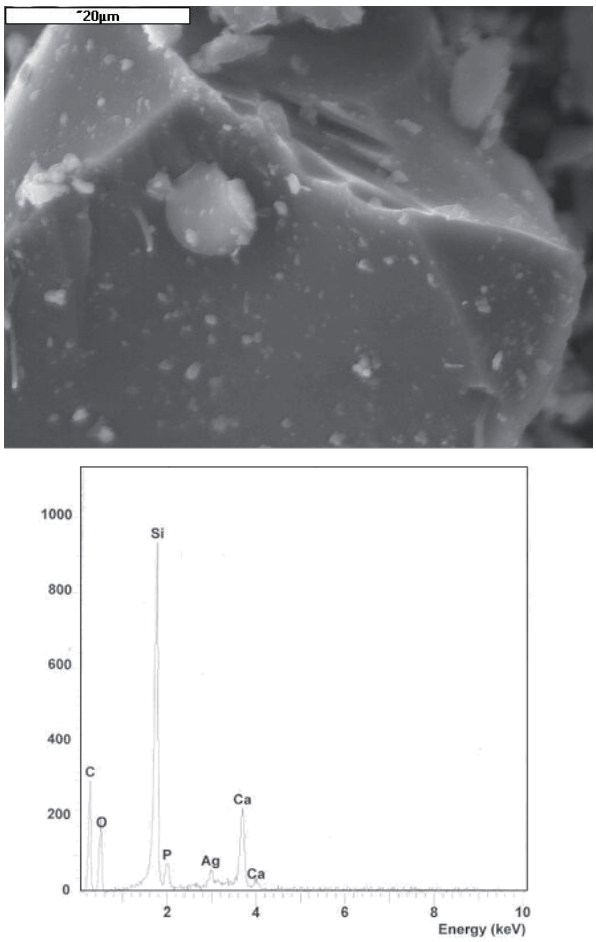


Rys. 4. Widma FTIR żeli serii ACe po wygrzewaniu w temperaturze 700°C: a) 0,5%CeO_2, b) 1%CeO_2, c) 2%CeO_2



Rys. 5. Dyfraktogramy materiałów SAg i AAg z 3% dodatkiem Ag_2O po obróbce termicznej w temperaturze 700°C

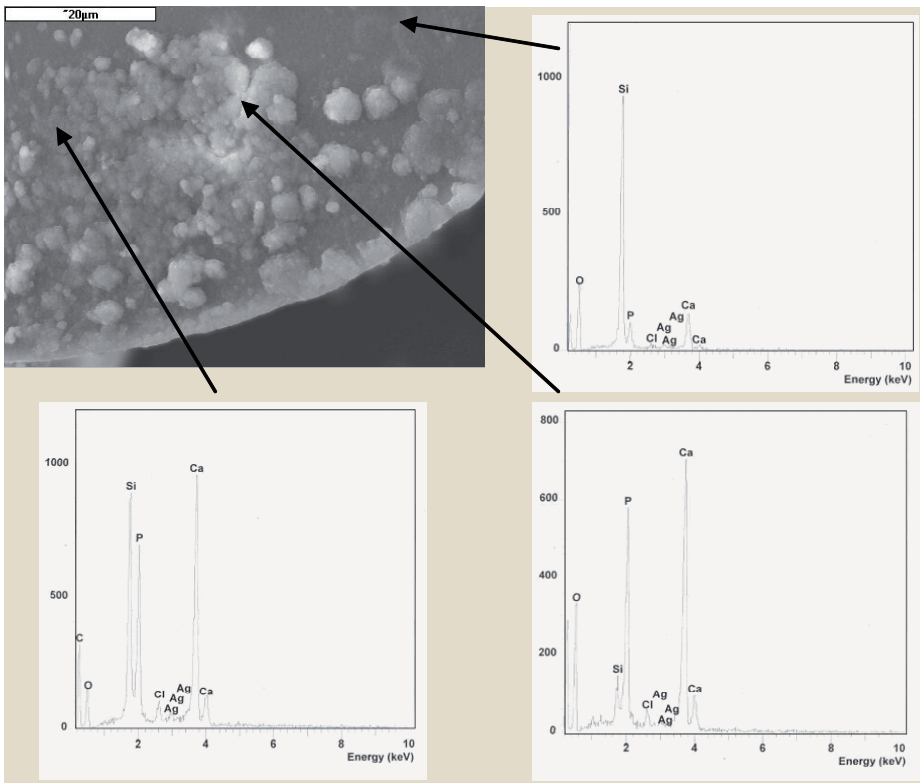
Obserwując powierzchnie badanych granul w mikroskopie skaningowym przed i po kontakcie z SBF stwierdzono zmiany ich morfologii. Zmiany zachodzące na powierzchni badanych proszków zachodziły jednak w odmienny sposób zależnie od ich składu chemicznego.



Rys. 6. Mikrostruktura (SEM) i analiza pierwiastkowa (EDAX) materiału SAg2 (2% Ag_2O) przed kontaktem z SBF

W przypadku materiałów serii S już po 3-dniowym kontakcie z płynem fizjologicznym zaobserwowano wzrost koncentracji Ca i P na znacznej powierzchni proszków, przy czym występowały tu obszary z widoczną krystalizacją kulistych, „kalafiorowatych" form (złożonych z Ca i P) oraz obszary bez wyraźnej krystalizacji częściowo wzbogacone w wapń i fosfor, przy wyraźnie niższej koncentracji krzemu. Widoczne także były obszary o wysokiej koncentracji Si. 10-dniowe zanurzenie materiałów w SBF prowadziło do dalszych zmian morfologii powierzchni związanych z tworzeniem się kulistych form fosforanu wapnia, nadal jednak obserwowano obszary o wysokiej koncentracji Si. Ponadto dla materiałów z dodatkiem srebra (3%) widoczne były pojedyncze wytrącenia kryształów AgCl. Praktycznie nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy materiałami serii SAg i SCe w ich zachowaniu się w płynie SBF. Natomiast w porównaniu z materiałami niemodyfikowanymi, dla których obserwuje się formowanie HAp podczas kontaktu z SBF już po 24h, tworzenie się powierzchniowej warstwy fosforanu wapnia następowało znacznie wolniej.

Dla materiałów serii AAg na powierzchni granul nie zaobserwowano charakterystycznych dla krystalizacji HAp kulistych form. Wzbogacona w wapń i fosfor faza o pokroju słupkowym widoczna na powierzchni materiału AAg0,5 jest również fosforanem wapnia, ale o zupełnie innym stosunku Ca/P niż w hydroksyapatycie. Materiały serii AAg nie tworzyły warstwy HAp nawet po 10 dniach zanurzenia w SBF,



Rys. 7. Mikrostruktura (SEM) i analiza pierwiastkowa (EDAX) materiału SAg2 (2% Ag_2O) po 3 dniach kontaktu z SBF

natomiast widoczne były wytrącenia Ag i AgCl. Nieco inaczej zachowywały się granulki serii ACe: po 3 dniach kontaktu z SBF niewielka część powierzchni granul o niskiej zawartości ceru (ACe0,5) pokryta była kulistymi formami o zwiększonej koncentracji Ca i P, widoczne były również powierzchnie wzbogacone w Si. Dopiero po 10 dniach inkubacji w SBF widoczne były nieliczne skupiska kulistych form wskazujące na tworzenie się HAp.

W przypadku tych materiałów (seria A) dodatek srebra i ceru wpływa na zdolność formowania HAp w SBF. Materiał podstawowy A2 (bez dodatku tych tlenków) w formie granul jest tak aktywny, że następuje szybkie rozpuszczanie wykrystalizowanej fazy fosforanowej [11]. Prawdopodobnie wprowadzenie do składu chemicznego CeO_2 zmniejsza aktywność chemiczną materiału, natomiast materiał z dodatkiem Ag_2O charakteryzuje równie wysoka aktywność chemiczna.

Wnioski

Przeprowadzone badania wskazują, że srebro wprowadzone do szkieł w ilości 2-3% znacznie przyspiesza i obniża temperaturę krystalizacji fosforanów i krzemianów wapnia, natomiast dodatek CeO_2 stabilizuje strukturę amorficzną materiałów. Obecność zarówno tlenku srebra jak i ceru w uzyskanych szkłach wpływa na ich właściwości bioaktywne w porównaniu z materiałami niemodyfikowanymi. Otrzymane materiały serii AAg, ACe charakteryzują się porównywalnie wysoką rozpuszczalnością w SBF jak szkła niemodyfikowane. Materiały niemodyfikowane serii A w formie granul nie formują na swojej powierzchni HAp podczas kontaktu z SBF natomiast w przypadku materiałów serii ACe po 3 dniach inkubacji w SBF obserwuje się zmianę morfologii powierzchni (powstawanie kulistych form) i wzrost zawartości Ca i P, co wskazuje na powierzchniową krystalizację fosforanów wapnia. W przypadku materiałów wysokokrzemianowych z dodatkiem Ag lub Ce (seria S) tworzenie się powierzchniowej warstwy HAp następuje w dłuższym czasie niż dla materiałów niemodyfikowanych.

Uzyskane materiały będą stanowić przedmiot badań biologicznych celem oceny ich właściwości bakteriobójczych na szczepy bakterii *Staphylococcus aureus i Escherichia coli*.

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach badań statutowych AGH-WIMiC w roku 2008, projekt nr 11.11.160.365.

Literatura

[1] Lansdown A.B., Silver. I: its antibacterial properties and mechanism of action. J Wound Care. 11(4) (2002) 125-130.
[2] Kim T.N., Feng Q.L., Kim J.O. i inn. J. Mat Sci.: Mat. In Medicine 9 (1998) 129-134.
[3] Leonelli C., Lusvardi G., Malavasi G. i inn, J. of Non-Crystl. Sol. 316 (2003) 196-216.
[4] Kawashita M., Tsuneyama S. Miyaji F., Kokubo T. i inn.: Biomaterials 21 (2000) 393-398.
[5] Bellantone M., Coleman N.J., Hench L.L.: Bioceramics. Key Eng. Mater. 192-195 (2001) 597-600.
[6] Verne E., Di Nunzio S., Bosetti M., Appendino P. i inn.: Biomaterials 26 (2005) 5111-5119.
[7] McMillan P.W.: Glass Ceramics, Academic Press, London, UK1979.
[8] Łączka M., Cholewa K., Łączka-Osyczka A.: J. Alloys and Comp. 248 (1997) 42-51.
[9] Cholewa-Kowalska K., Łączka M., Osyczka A.: Euro Ceramics VII, vol. 206-213, Part 3,Chapter 10 (2002) 1559-1562.
[10] Łączka M., Cholewa-Kowalska K., Zamorska L., Sindut R., Czajkowska B.: Ceramika / Ceramics 80 (2003) 217-222.
[11] Sindut R., praca doktorska, AGH, Kraków 2005.